

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-275662

(43)Date of publication of application : 09.10.2001

(51)Int.Cl.

C12N 5/06
// A61K 35/16

(21)Application number : 2000-101022

(71)Applicant : EMI NOBUHIKO
JAPAN TISSUE ENGINEERING:KK

(22)Date of filing : 03.04.2000

(72)Inventor : EMI NOBUHIKO
SUZUKI SATORU

(54) HUMAN SERUM AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain human serum capable of being continuously available in a large amount and provide a method for producing the human serum capable of effectively using blood cells and platelets by using blood plasma as a raw material.

SOLUTION: This human serum is produced from blood plasma collected from blood collectable people as a raw material and used for culturing or preserving human cells, tissues or organs. The blood plasma is preferably the one already inspected through a screening against inflammation diseases and preserved in a frozen state at ≤ -20 C for one year or more. The human serum is produced by adding thrombin and calcium ion to blood plasma to coagulate a blood coagulation factor in the plasma and removing the coagulated blood coagulation factor. It is preferable to bring the concentration of thrombin added to the blood plasma to 4000-10000 N.I.H.Unit/litter and the concentration of calcium ion added to the blood plasma to 1-5 mM.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-275662

(P2001-275662A)

(43) 公開日 平成13年10月9日 (2001.10.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テラコード (参考)
C 1 2 N 5/06		A 6 1 K 35/16	4 B 0 6 5
// A 6 1 K 35/16		C 1 2 N 5/00	E 4 C 0 8 7

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2000-101022(P2000-101022)

(22) 出願日 平成12年4月3日 (2000.4.3)

(71) 出願人 300015942

恵美 宜彦

愛知県名古屋市昭和区宮東町291-2

(71) 出願人 399051858

株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジ
ニアリング

愛知県蒲郡市三谷北通6丁目209番地の1

(72) 発明者 恵美 宜彦

名古屋市昭和区宮東町291-2

(72) 発明者 鈴木 哲

名古屋市南区赤坪町228

(74) 代理人 100068755

弁理士 恩田 博宣 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト血清及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 大量かつ継続的に入手できるヒト血清を提供する。また血漿を原料にすることにより血球及び血小板を有効利用できるヒト血清の製造方法を提供する。

【解決手段】 ヒト血清は、通常の採血が可能な人から採取した血漿を原料として製造されるものであり、ヒトの細胞、組織又は臓器を培養したり、保存したりするために利用される。前記血漿は、感染症に対するスクリーニング検査済みのもの、及び-20℃以下で1年以上凍結保存されたものであるのが好ましい。このヒト血清は、血漿にトロンビンとカルシウムイオンを添加して血漿中の血液凝固因子を凝固させた後、その凝固された血液凝固因子を除去することによって製造される。前記血漿中に添加するトロンビン濃度を4000~10000 N.I.H.Unit/リットル、血漿中に添加するカルシウムイオン濃度を1~5 mMとするのが好ましい。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 通常の採血が可能な人から採取した血漿を原料として製造され、ヒトの細胞、組織又は臓器を培養したり、保存したりするために利用することを特徴とするヒト血清。

【請求項2】 前記血漿は、感染症に対するスクリーニング検査済みのものである請求項1に記載のヒト血清。

【請求項3】 前記血漿は、 -20°C 以下の温度で1年以上凍結保存されたものである請求項1又は請求項2に記載のヒト血清。

【請求項4】 血漿に、トロンビンとカルシウムイオンを添加して血漿中の血液凝固因子を凝固させた後、その凝固された血液凝固因子を除去してヒト血清を得ることを特徴とするヒト血清の製造方法。

【請求項5】 前記血漿中に添加するトロンビンの濃度を $4000\sim10000\text{N.I.H. Unit/リットル}$ とするとともに、カルシウムイオンの濃度を $1\sim5\text{mM}$ とした請求項4に記載のヒト血清の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、ヒト血清及びその製造方法に関するものである。より詳しくは、ヒトの細胞、組織又は臓器を培養したり、保存したりするために利用されるヒト血清及びその製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来より、この種のヒト血清としては、例えば、同一個体間で移植を行う場合の提供組織又は臓器（以下、自己移植片と記載する）をインビトロ（in vitro）で培養する際の培地に添加される自己血清が知られている。この自己血清は、前記自己移植片の提供者から採血した血液から分離されたものであり、前記自己移植片をインビトロで培養する際に、主としてその自己移植片を構成する細胞の増殖を促進させるために添加される。そして、この自己血清をその提供者の自己移植片を培養するために使用することによって、その自己移植片に対して未知の感染症による感染のおそれをなくすることができる。

【0003】一方、従来より、血清の製造方法としては、例えば、ウシ、ヒツジ、ウマ等の温血動物から採血された血液を用いて血清を製造する方法が知られている。これらの血清を製造する際には、まず、前記温血動物から血液を採血した後、その血液を所定の容器内で無菌的に空気と接触させながら十分な時間放置する。すると、その血液中の血液凝固因子が血球を絡め取りながら凝固して血餅を沈澱させるとともに、その血餅の上方には黄淡色の液体である血清が溜められる。最後に、遠心分離機等を用いて前記血清を血餅と分離することによって温血動物の血清が得られる。また、上記自己血清についても同様に製造されていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】ところが、前記従来の自己血清では、自己移植片の提供者から採血された血液を用いて製造されていたことから、前記提供者の健康上の問題を考えると、1人の提供者から一度に採血することができる血液量に大幅な制約があった。さらに、前記自己移植片の提供者は、組織又は臓器に障害を持っている患者であることから、採血が不可能な場合が多く、常に利用できるとは限らなかった。

10 【0005】一方、前記従来の温血動物血清の製造方法では、温血動物の血液から血清を製造する際に、血球、血小板及び血液凝固因子をひとまとめに血餅として沈澱させてしまっていたことから、各成分毎に分離して再利用することができなかった。さらに、前記自己血清についても同様である。そして、これらの血清の原料となる血液は、採取できる量に大幅な制限があるうえ非常に高価なものであることから、可能な限り有効利用するために努力することが共通の課題である。特に、ヒトの血液中含有されている血球及び血小板は、様々な治療に使用することができることから利用価値が非常に高く、血餅としてひとまとめに捨てられてしまうのは有用な資源を無駄にしていると考えられる。

【0006】この発明は、上記のような従来技術に存在する問題点に着目してなされたものである。その目的とするところは、大量かつ継続的に入手することができるヒト血清を提供することにある。その他の目的とするところは、血漿を原料にすることにより、血球及び血小板を有効利用することができるヒト血清の製造方法を提供することにある。

30 【0007】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成するために、請求項1に記載の発明のヒト血清は、通常の採血が可能な人から採取した血漿を原料として製造され、ヒトの細胞、組織又は臓器を培養したり、保存したりするために利用することを特徴とするものである。

【0008】請求項2に記載の発明のヒト血清は、請求項1に記載の発明において、前記血漿は感染症に対するスクリーニング検査済みのものであるものである。請求項3に記載の発明のヒト血清は、請求項1又は請求項2に記載の発明において、前記血漿は、 -20°C 以下の温度で1年以上凍結保存されたものであるものである。

【0009】請求項4に記載の発明のヒト血清の製造方法は、血漿に、トロンビンとカルシウムイオンを添加して血漿中の血液凝固因子を凝固させた後、その凝固された血液凝固因子を除去してヒト血清を得ることを特徴とするものである。

【0010】請求項5に記載の発明のヒト血清の製造方法は、請求項4に記載の発明において、前記血漿中に添加するトロンビンの濃度を $4000\sim10000\text{N.I.H. Unit/リットル}$ とするとともに、カルシウムイオンの濃

50

度を1～5 mMとしたものである。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、この発明の実施形態を詳細に説明する。血清は、血液中から血球及び血小板を取り除くとともに、フィブリノーゲン（血液凝固Ⅰ因子）、プロトロンビン（血液凝固Ⅱ因子）、血液凝固Ⅴ因子、血液凝固ⅥⅢ因子等の幾つかの血液凝固因子を取り除いたものである。一方、血漿は、血液中から血球及び血小板を取り除いたものであり、前記幾つかの血液凝固因子を含有している。

【0012】本実施形態のヒト血清（以下、ヒトプラズマ血清と記載する）は、通常の採血が可能な人から採取した血漿を原料として製造され、ヒトの細胞、組織又は臓器を培養したり、保存したりするために利用するものである。

【0013】前記通常の採血が可能な人としては、一般に健康な人を指し、特に日本赤十字社における献血基準を満たしている人であるのが好ましい。この通常の採血が可能な人としては、例えば、循環器系疾患や血液疾患等の採血により病状が悪化するおそれがある人、ビタミン剤や一般的な胃腸薬等の保健薬を除く薬剤を服薬中の

人、有熱者等の健康状態が良くない人、及び妊娠中、授乳中又は6ヶ月以内に産後若しくは早産をした人は、健康上の問題から通常の採血が不可能な人として除外される。

【0014】また、前記通常の採血が可能な人としては、年齢、体重、血圧、血液比重又は血色素量、及び年間総採血量が所定の採血基準を満たしている人であるのが好ましい。

【0015】前記年齢についての採血基準としては、16～69歳であるのが好ましく、18～69歳であるのがより好ましいが、65歳以上の人については60～64歳の間に採血経験がある人が好ましい。この年齢が16歳未満及び69歳を超える場合には、健康を害するおそれがある。前記体重についての採血基準としては、男性なら45 kg以上、女性なら40 kg以上であるのが好ましく、さらに男女とも50 kg以上であるのがより好ましい。この男性の体重が45 kg未満の場合及び女性の体重が40 kg未満の場合には、健康を害するおそれがある。前記血圧についての採血基準としては、最高血圧が90 mmHg以上であるのが好ましい。この最高血圧が90 mmHg未満の場合には、採血による血圧低下によって健康を害するおそれがある。

【0016】前記血液比重についての採血基準としては、1.052 g/ml以上であるのが好ましく、1.053 g/ml以上であるのがより好ましい。この血液比重が1.052 g/ml未満の場合には、採血によって貧血状態となって健康を害するおそれがある。また、前記血色素量についての採血基準としては、12 g/dl以上であるのが好ましく、12.5 g/dl以上であ

るのがより好ましい。この血色素量が12 g/dl未満の場合には、採血によって貧血状態となって健康を害するおそれがある。前記年間総採血量についての採血基準としては、男性なら1200 ml以下、女性なら800 ml以下であるのが好ましい。この男性の年間総採血量が1200 mlを超える場合及び女性の年間総採血量が800 mlを超える場合には、健康を害するおそれがある。

【0017】加えて、前記通常の採血が可能な人であっても、例えば、エイズウイルス（HIV）の感染者又はそのおそれのある人、過去又は現在において心臓病、肝臓病、マラリア、脳卒中、血液疾患、ガン、痙攣、腎臓病、糖尿病、結核、喘息、アレルギー疾患、乾癬、梅毒に罹患したか罹患している人、6ヶ月以内に伝染性単核球症に罹患した人、3週間以内に麻疹、風疹、おたふく風疹に罹患した人、1ヶ月以内に発熱を伴う激しい下痢をした人、家族にA型肝炎やリンゴ病（伝染性紅斑）を発症した人、1年以内に予防接種を受けた人、1年以内に海外旅行（特にマラリア流行地に旅行）をした人、3年以内に海外（特にマラリア流行地）に居住した経験のある人、1年以内にピアス又は刺青をした人、輸血や臓器の移植を受けたことがある人、B型又はC型肝炎ウイルス保有者（キャリア）、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）又はその類縁疾患患者、CJD又はその類縁疾患患者の血縁者、ヒト由来成長ホルモン注射、角膜移植、硬膜移植を伴う脳外科手術を受けた人、3日以内に抜歯した人から採取された血漿は、それらの感染症等が感染する可能性があることから使用しないのが好ましい。

【0018】ヒトプラズマ血清の原料となる血漿は、前記通常の採血が可能な人から全血採血又は血漿成分採血により採取し、必要に応じて分離されたものである。さらに、この血漿としては、非常に高品質であることから、日本赤十字社において献血（全血献血又は血漿成分献血）されたものであるのが好ましい。

【0019】また、前記献血により採取された血漿のうち、血漿としての使用期限切れにより廃棄処分される新鮮凍結血漿を有効利用するのがより好ましい。この新鮮凍結血漿は、採血されてから使用されずに-20℃以下の温度で1年以上経過したものであり、その中に含まれる血液凝固因子の凝固能力が低下して血液凝固を目的とする血漿としての使用には適さないものと推定されるが、血清としての有効成分の劣化はほとんど見られず、ヒトプラズマ血清としての使用には十分に適したものである。

【0020】さらに、前記血漿としては、例えば、ヒトプラズマ血清をヒトの細胞、組織又は臓器を培養するための培地に添加して使用する際に、その細胞や組織等に病気が移らないようにするために、種々の感染症に対するスクリーニング検査済みのものであるのが好ましい。

また、前記スクリーニング検査としては、特に日本赤十字社で行われるスクリーニング検査であるのが好ましく、この場合には治療のために人体に投与してもほとんど問題が起らない。

【0021】このスクリーニング検査としては、例えば、不規則抗体検査、梅毒血清学的検査、HBウィルス関連検査、ALT (GPT) 検査、HIV抗体検査、HTLV-I抗体検査、HCV抗体検査が挙げられる。そして、これらの検査による異常が認められなかった血漿が、ヒトブラズマ血清の原料として好適に使用される。

【0022】前記不規則抗体検査は、血液又は血漿中に保有されている抗A抗体 (A型の人の血球を凝集させる抗体) 及び抗B抗体 (B型の人の血球を凝集させる抗体) 以外の抗体である不規則抗体の有無を検査するものである。前記梅毒血清学的検査は、梅毒に感染した人の血液又は血漿中に産生された抗体の有無を検査するものである。

【0023】前記HBウィルス関連検査は、B型肝炎を引き起こすHBウィルスの抗原の有無を検査するためのHBs抗原検査と、前記HBウィルスに対して特異的に反応する免疫グロブリン (抗体) の体内での産生の有無を検査するためのHBs抗体検査とから構成される。前記ALT (GPT) 検査は、肝炎の初期から上昇する酵素 (アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 又はグルタミン酸γピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)) の血液中濃度又は血漿中濃度を調べて、肝炎ウィルスや未知のウィルス等の感染の有無を検査するものである。

【0024】前記HIV抗体検査は、エイズウィルスであるHIV-1及びHIV-2に対する抗体の有無を検査するものである。前記HTLV-I抗体検査は、成人T細胞白血病 (Adult T-cell Leukemia) を引き起こすウィルス (Human T-cell Lymphotropic Virus-I) の感染の有無を検査するものである。前記HCV抗体検査は、非A非B型肝炎であるC型肝炎の原因ウィルスであるHCV (Hepatitis C Virus) に対する抗体の有無を遺伝子工学的に検査するものである。

【0025】上記のように構成されたヒトブラズマ血清は、例えば、ヒトの細胞、組織又は臓器を培養したり、保存したりするために利用される。このヒトブラズマ血清中には、ヒトの細胞の増殖を促進させるための増殖因子や、ヒトの細胞を凍結保存する際の添加物として使用されるアルブミン等が含有され、それらの作用によってヒトの細胞を効率的に培養して増殖させたり、凍結保存することができるようになっている。

【0026】次に、上記ヒトブラズマ血清の作用について説明する。上記ヒトブラズマ血清は、通常の採血が可能なる人から採取した血漿に、所定濃度のトロンビン (フィブリノゲナーゼ又は血液凝固IIa因子) とカルシウムイオン (血液凝固IV因子) を添加して血漿中の血液凝固

因子を凝固させた後、その凝固された血液凝固因子を除去することによって製造される。

【0027】前記ヒトブラズマ血清の原料となる血漿は、通常の採血が可能なる人から血漿成分採血により直接得られるか、又は全血採血により採取された血液から分離することによって得られる。前記血漿を血液から分離する際には、例えば、遠心機を用いて血球及び血小板が沈澱する回転数で血液を遠心分離した後、遠心チューブ内で沈澱した血球及び血小板を除去することによって分離される。

【0028】また、前記血漿として、日本赤十字社の新鮮凍結血漿を使用することができる。さらに、前記新鮮凍結血漿のうち、採血から1年以上経過して廃棄処分される予定のものを使用するのが好ましく、この場合には廃棄処分される予定の新鮮凍結血漿を有効利用することができるうえ経済的である。

【0029】さらに、前記血漿には、血漿中の血液凝固因子の凝固を抑制するために、通常、ACD (Acid Citrate Dextrose Solution) 等の抗凝固保存剤が添加されており、日本赤十字社の新鮮凍結血漿にもACDが所定量含有されている。そして、この血漿は、通常採血されてから-20℃以下の温度で凍結保存され、必要に応じて解凍して使用される。

【0030】前記トロンビンは、血漿中の血液凝固因子を強制的に凝固させるために添加される。この血漿中に添加するトロンビンの濃度は、4000~10000 N.I.H.Unit/リットルであるのが好ましく、8000 N.I.H.Unit/リットルであるのが最も好ましい。このトロンビンの濃度が4000 N.I.H.Unit/リットル未満の場合には、血漿中の血液凝固因子が十分に凝固しないおそれがあり、その場合にはヒトブラズマ血清中に血液凝固因子が残留して、例えば細胞培養中に培地が凝固してしまうおそれがある。逆に10000 N.I.H.Unit/リットルを越える場合には不経済である。

【0031】前記カルシウムイオンは、前記トロンビンによる血液凝固因子の凝固を促進させるために添加される。この血漿中に添加するカルシウムイオンの濃度は、1~5 mMであるのが好ましく、2 mMであるのが最も好ましい。このカルシウムイオンの濃度が1 mM未満の場合には、トロンビン等を十分に活性化させることができないことから、血漿中の血液凝固因子が十分に凝固しないおそれがある。さらにこのとき、例えば、ヒトブラズマ血清をヒトの細胞、組織又は臓器を培養するための培地に添加したとき、培養途中で血液凝固因子が凝固して培地が固まってしまうおそれがある。

【0032】逆に5 mMを越える場合には、カルシウムイオンの濃度が高すぎることから、例えば、ヒトブラズマ血清をヒトの細胞、組織又は臓器を培養するための培地に添加したとき、通常の培養に用いられるカルシウムイオン濃度よりも高くなるおそれがあり、細胞培養等に

適さない。さらにこのとき、ヒトの細胞、組織又は臓器の培養途中に、カルシウムを含む不溶解性の結晶が培地中に析出し、細胞、組織又は臓器に対して悪影響を与えるおそれもある。

【0033】また、ACD等のカルシウムイオンをキレート化する抗凝固保存剤が血漿中に過剰量添加されている場合には、前記カルシウムイオン濃度は、1~5mMに加えて、過剰量に相当する抗凝固保存剤がキレート化されて相殺されるカルシウムイオン濃度を加えた濃度にするのが好ましい。

【0034】このヒトプラズマ血清を製造する際には、まず、前記血漿に所定濃度のトロンビンとカルシウムイオンを添加して所定のインキュベーション温度でインキュベートする。このとき、血漿中に含有されているフィブリノーゲンは、カルシウムイオンによって活性化されたトロンビンの酵素反応によって切断され、フィブリンに転換される。

【0035】前記インキュベーション温度としては、好ましくは32~42℃、より好ましくは36~38℃である。このインキュベーション温度が32℃未満の場合及び42℃を越える場合には、トロンビンの酵素活性が低いことから、フィブリノーゲンの切断速度が著しく低下する。また、前記インキュベーション時間としては、血漿中のフィブリノーゲンのほとんど全てがフィブリンに転換される時間であるのが好ましい。

【0036】次に、前記フィブリンを含有する血漿を所定温度で静置する。このとき、前記血漿中のフィブリン分子は、分子間架橋してフィブリン網を形成し、液状であった血漿がゲル状又はペースト状の凝固物に変化する。前記所定温度としては、好ましくは0~10℃、より好ましくは4~6℃である。この温度が0℃未満の場合には、血漿が凍結してフィブリン網が形成され難くなる。逆に10℃を越える場合には、熱運動が激しくなることによりフィブリン分子同士が分子間架橋され難くなることから、フィブリン網が形成され難くなる。また、前記静置時間としては、血漿中のフィブリンのほとんど全てが分子間架橋するまでの時間であるのが好ましい。

【0037】最後に、前記凝固物を遠心分離機等を用いて、固形状のフィブリン網と液状の血清分画とに分離することによって、液状の血清分画であるヒトプラズマ血清が得られる。さらに、フィルターを用いて血清分画中に残留しているフィブリン網をろ過することによってヒトプラズマ血清を精製するのが好ましい。

【0038】さて、上記のようにして製造されたヒトプラズマ血清を、ヒトの細胞、組織又は臓器をインビトロで培養する際の培地に添加したときには、血液凝固因子が充分に除去されていることから、培養中に培地が凝固されることがない。そして、培養中の細胞、組織又は臓器に悪影響を与えることなく、ヒトプラズマ血清中に含有されている増殖因子がヒトの細胞、組織又は臓器の増

殖を促進させる。

【0039】一方、このヒトプラズマ血清を、例えば骨髓細胞、組織細胞、臍帯血等のヒトの細胞、組織又は臓器を凍結保存するために使用したときには、前記細胞、組織又は臓器を保存するための保存用液（通常は培養用の培地と細胞破壊抑制剤が含有されている）に添加して凍結保存することによって、ヒトプラズマ血清中に含有されているアルブミンが凍結によるショック等を緩和させる。また、前記アルブミン以外にも未知のヒトプラズマ血清中の成分が前記ショック等を緩和させる可能性もある。

【0040】上記実施形態によって発揮される効果について、以下に記載する。

・ 実施形態のヒトプラズマ血清は、通常の採血が可能な人から採取した血漿を原料として製造されたものであり、ヒトの細胞、組織又は臓器を培養したり、保存したりするために利用するものである。このため、前記従来の自己血清のように、組織や臓器等に障害を持った患者から採血する場合とは異なり、健康な人から採取された原料を使用することから、ヒトプラズマ血清を大量かつ継続的に入手することができる。

【0041】さらに、治療に際して、前記患者の精神的、身体的負担を著しく軽減させることもできる。加えて、前記従来の自己血清では、1人の提供者から採血されていたことから、一度に採取することができる量に制限があったのに対し、本実施形態のヒトプラズマ血清では、複数人から採取されたものを使用することが可能であることから、より大量のヒトプラズマ血清を得ることができる。また、このヒトプラズマ血清は、血清中に含有されている各成分が凍結保存に対して非常に安定であることから、長期間保存することができて随時利用することができる。

【0042】さらに、このヒトプラズマ血清は、前記従来の自己血清及び温血動物血清のように血液を原料とする場合とは異なり、血液中の血球及び血小板を分離した後の血漿を原料にすることにより、その分離された血球及び血小板を有効利用することも可能である。

【0043】一方、一般に温血動物の細胞、組織又は臓器を培養したり、保存したりする際には、ウシ胎児血清(FCS)等のヒト以外の温血動物から採取された血清が使用されていた。ところが、前記FCSは、ウシに特有なウィルスが混入されている可能性があるうえ、CJDを引き起こすプリオンやヒトに感染するおそれのあるウィルス等が混入されている可能性もあった。このような血清を治療を目的とするヒトの細胞、組織又は臓器の培養に利用することについては、医学的及び倫理的な観点からコンセンサスを得るのはほとんど不可能に近い。それに対して、本実施形態のヒトプラズマ血清では、ヒト以外の温血動物に特有なウィルス等が混入されているおそれがないことから、医学的及び倫理的なコンセンサ

10

20

30

40

50

スが容易に得られ、実際の治療に適用が可能である。

【0044】・ ヒトブラズマ血清の原料である血漿として、種々の感染症に対するスクリーニング検査済みのものを使用することによって、ヒトの生体内に移植される治療を目的とするヒトの細胞、組織又は臓器を培養したり、保存したりする際に、感染症の感染を防止することができる。

【0045】・ ヒトブラズマ血清の原料である血漿として、 -20°C 以下の温度で1年以上凍結保存されたものを使用することによって、血漿及びヒトブラズマ血清を容易に有効利用することができて経済的である。すなわち、採血から1年以内の血漿は、その中に含まれる血液凝固因子を、主に外傷や外科手術時の血液凝固因子の確保、それらの欠乏による出血傾向時の補充、不時の出血によるショック症状に対する応急処置、又は血液凝固因子製剤の製造のために有効利用することができる。さらに、採血から1年以上経過した血漿は、所定の製造工程を経てヒトブラズマ血清となり、ヒトの細胞、組織又は臓器を培養したり、保存したりするために有効利用することができて大変経済的である。

【0046】さらに、前記血漿として、使用期限切れになった日本赤十字社の新鮮凍結血漿を有効利用することによって、廃棄処分される予定の血漿を有効利用することができて経済的である。加えて、献血者の善意を無駄にせずすむことから大変に好ましいうえ、献血にかかる莫大な労力と時間も無駄にせずすむことから好ましい。

【0047】・ 本実施形態のヒトブラズマ血清は、血漿にトロンビンとカルシウムイオンを添加して血漿中の血液凝固因子を凝固させた後、その凝固された血液凝固因子を除去することによって製造するものである。このため、前記従来の血液から血餅を沈澱させて血清を製造する場合とは異なり、血液中の血球及び血小板を分離した後の血漿を原料にすることにより、その分離された血球及び血小板を有効利用することができる。また、血漿成分採血によって得られた血漿を原料にする場合には、採血時に血球及び血小板が血漿提供者の体内に戻されることから、その血球及び血小板は提供者の体内で有効に利用され得る。

【0048】さらに、ヒトブラズマ血清を製造するために使用期限切れの血漿を使用する場合には、使用期間内に血漿中の血液凝固因子を利用することができることから、血液凝固因子の一部も有効に利用することが可能である。

【0049】・ ヒトブラズマ血清を製造する際に、血

漿中に添加するトロンビンの濃度を $4000\sim10000\text{N.I.H.Unit/リットル}$ とするとともに、血漿中に添加するカルシウムイオンの濃度を $1\sim5\text{mM}$ とすることによって、血漿中の血液凝固因子を容易かつ確実に凝固させて取り除くことができる。さらに、ヒトブラズマ血清中のカルシウムイオン濃度を、細胞、組織又は臓器の培養に適した濃度に容易に調整することができる。

【0050】

【実施例】以下、上記実施形態を具体化した実施例について説明する。

(ヒトブラズマ血清の製造) 500ml ガラスビンに新鮮凍結血漿「日赤」(日本赤十字社製)を約 300ml 入れた後、 2M CaCl_2 を $300\mu\text{l}$ 加えるとともに、トロンビン(三共株式会社製、 $5000\text{N.I.H.Unit/vial}$)を 2.4ml 加えた。従って、この血漿中に添加したカルシウムイオンの濃度は約 2mM であり、トロンビンの濃度は約 $8000\text{N.I.H.Unit/リットル}$ である。続いて、前記ガラスビン中の血漿を 37°C で1時間インキュベートした後、 4°C で48時間静置したところ、プリン状に凝固した凝固物となった。

【0051】次に、前記プリン状の凝固物を 50ml 遠心チューブに移し、 3000r.p.m. で20分間遠心分離した。続いて、遠心チューブ内の上清を $0.8\mu\text{m}$ のフィルターユニット(ナルゲン社製)及び $0.22\mu\text{m}$ のフィルターユニット(ミリポア社製のMILLEX-GP)を通過させてろ過した後、 4°C で48時間静置して残留しているフィブリンを析出させた。

【0052】次に、 56°C で30分間インキュベートすることによって補体を不活化させた後、 3000r.p.m. で20分間遠心分離した。続いて、遠心チューブ内の上清を $0.8\mu\text{m}$ のフィルターユニット及び $0.22\mu\text{m}$ のフィルターユニットを通過させてろ過することにより、前記析出させたフィブリンを除去してヒトブラズマ血清を得た。また、このヒトブラズマ血清は、最終的に 4°C 又は -80°C で冷蔵保存又は凍結保存された。

【0053】(ヒトブラズマ血清の評価)上記のようにして製造されたヒトブラズマ血清を成分分析した結果を表1及び表2に示す。なお、表1において、FDPはフィブリン・フィブリノーゲン分解産物(Fibrin and Fibrinogen Degradation Products)を示す。また、表2におけるA/Gは、アルブミン画分の重量とグロブリン画分の重量(α_1 、 α_2 、 β 及び γ グロブリン画分の総重量)との比を示す。

【0054】

【表1】

検査項目	結果	備考
総タンパク	5.9 g/dl	
β_2 -ミクログロブリン	0.9 mg/l	
遊離ヘモグロビン	2.0 mg/dl以下	
ハプトグロビン	56.0 mg/dl	2-2型
FDP定量	2 μ g/ml以下	
Dダイマー	30 ng/ml以下	
総脂質	381 mg/dl	
トリグリセリド	88 mg/dl	
総コレステロール	141 mg/dl	
浸透圧	357 mOsm/kgH ₂ O	
フィブリノーゲン	20 mg/dl以下	

【0055】

【表2】

検査項目	結果
アルブミン画分	55.4重量%
α_1 グロブリン画分	2.6重量%
α_2 グロブリン画分	12.0重量%
β グロブリン画分	11.6重量%
γ グロブリン画分	18.4重量%
A/G	1.2

次に、このヒトブラズマ血清中の一般細菌及び真菌の混入を調べたところ、両菌ともに全く混入が見られなかったことが確認された。

【0056】次に、RPMI-1640培地中に前記ヒトブラズマ血清を10%添加し、ヒト白血病細胞株HL-60及びJurkat細胞を培養した。その結果、前記両細胞ともに良好な増殖を示したことが確認された。また、培地の凝固は全く起こらなかったことも確認された。

【0057】なお、本実施形態は、次のように変更して具体化することも可能である。

・ ヒトブラズマ血清中に含有されるカルシウムイオン濃度を1~5mMとすること。このように構成した場合には、ヒトの細胞、組織又は臓器を培養したり、保存したりするための利用に適したものとすることができる。

【0058】・ 例えば、アルブミン画分、グロブリン画分(α_1 グロブリン画分、 α_2 グロブリン画分、 β グロブリン画分、 γ グロブリン画分)、補体系のタンパク質成分、リポタンパク質(キロミクロリポタンパク質、超低密度リポタンパク質、中間型リポタンパク質、低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質、超高密度リポタンパク質)、プロテアーゼインヒビター(α_1 アンチトリプシン、アンチキモトリプシン、 α_2 マクログロブリン等)、免疫グロブリン(IgG、IgA、IgM、IgD、IgE)、輸送タンパク質(プレアルブミン、アルブミン、チロキシン結合タンパク質、レチノール結合タンパク質、セルロプラスミン、トランスフェリン、ハプトグロビン、ヘモベキシン等)、バッセンジャータンパク質(α フェトプロテイン、妊娠タンパク質、酵素、ホルモン等)等のヒトブラズマ血清中に含有されている医薬品等に利用可能な成分を精製するための原料

としてヒトブラズマ血清を使用すること。このように構成した場合には、ヒトブラズマ血清から有用な医薬品等を容易に製造することができる。

【0059】・ ヒトブラズマ血清を製造する際の原料として、複数人から採取された血漿を混合したものを原料として使用すること。このように構成した場合には、一度に大量の血漿を処理することができることから、ヒトブラズマ血清の大量生産に要する手間と製造コストを容易に低減させることができる。

【0060】・ ヒトブラズマ血清を製造する際に血漿中に添加されるトロンビンの代わりに、血液凝固II因子、血液凝固III因子、血液凝固V因子、血液凝固VII因子、血液凝固VIIa因子、血液凝固VIII因子、血液凝固IX因子、血液凝固IXa因子、血液凝固X因子、血液凝固Xa因子、血液凝固XI因子、血液凝固XIa因子、血液凝固XII因子、血液凝固XIIa因子、プレカリクレイン及び高分子キニノーゲンから選ばれる少なくとも1種のトロンビンを生成させ得るものを添加すること。このように構成した場合でも、トロンビンを生成させて血漿中のフィブリノーゲンをフィブリンに転換し、血液凝固因子を凝固させることができる。

【0061】・ ヒトブラズマ血清を製造する際に、血漿中にトロンビン及び前記トロンビンを生成させ得るものを添加すること。このように構成した場合には、トロンビンの作用をより一層向上させることができることから、血漿中の血液凝固因子の凝固を促進させることができる。

【0062】・ ヒトブラズマ血清を製造する際に、血漿中に血液凝固XIII因子又は血液凝固XIIIa因子を添加すること。このように構成した場合には、フィブリン分子間架橋をより一層促進させることができることから、フィブリン網の形成を促進させることができる。

【0063】・ ヒトブラズマ血清を製造する際に、通常の採血が可能な人以外の人から採取した血漿を原料として使用すること。前記通常の採血が可能な人以外の人としては、例えば、自己移植片の提供者、又は健康な人から採取された細胞、組織若しくは臓器を移植される予定の患者(例えば骨髄移植予定者や臍帯血移植予定者等)が挙げられる。このように構成した場合でも、ヒト

プラズマ血清を製造することができる。

【0064】・ ヒトプラズマ血清を製造するための原料として、採取された直後の血漿を使用すること、或いは-20℃以下の温度で凍結保存された血漿であって、採血されてから1年未満（例えば、6ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月）の血漿を使用すること。このように構成した場合でも、ヒトプラズマ血清を容易に製造することができ、またその有効性についても1年以上凍結保存されたものと変わらない。

【0065】さらに、前記実施形態より把握できる技術的思想について以下に記載する。

(1) 前記血漿は廃棄処分される予定のものである請求項3に記載のヒト血清。このように構成した場合、廃棄処分される予定の血漿を有効利用することができる。

【0066】(2) 前記血漿は献血により採取されたものである請求項1から請求項3及び前記(1)のいずれかに記載のヒト血清。このように構成した場合、ヒト血清の品質を容易に向上させることができる。

【0067】(3) 前記血漿は、日本赤十字社で採取されたものである請求項1から請求項3、前記(1)及び前記(2)のいずれかに記載のヒト血清。このように構成した場合、ヒトの治療を目的とするヒトの細胞、組織又は臓器を培養したり、保存したりするのに容易に適したものとすることができる。

【0068】(4) カルシウムイオンの濃度が1~5 mMである請求項1から請求項3及び前記(1)から前記(3)のいずれかに記載のヒト血清。このように構成した場合、ヒトの細胞、組織又は臓器を培養したり、保存したりするための利用に適したものとすることができる。

【0069】(5) 前記血漿は通常の採血が可能な人から採取されたものである請求項4又は請求項5に記載のヒト血清の製造方法。このように構成した場合、ヒト*

* 血清を容易かつ大量に製造することができる。

【0070】(6) 前記血漿は、複数人から採取した血液を混合した後に分離されたもの、複数人から採取した血液から分離した血漿を混合したもの、又は複数人から採取された血漿を混合したものである請求項4、請求項5及び前記(5)のいずれかに記載のヒト血清の製造方法。このように構成した場合、ヒト血清をより一層容易かつ大量に製造することができる。

【0071】(7) 血液から血球及び血小板を取り除いて血漿を分離した後、その血漿にトロンビンとカルシウムイオンを添加して血漿中の血液凝固因子を凝固させた後、その凝固された血液凝固因子を除去してヒト血清を得ることを特徴とするヒト血清の製造方法。このように構成した場合、血漿を原料にすることにより、血球及び血小板を有効利用することができる。

【0072】

【発明の効果】以上詳述したように、この発明によれば、次のような効果を奏する。請求項1に記載の発明のヒト血清によれば、大量かつ継続的に入手することができる。

【0073】請求項2に記載の発明のヒト血清によれば、請求項1に記載の発明の効果に加えて、感染症の感染を防止することができる。請求項3に記載の発明のヒト血清によれば、請求項1又は請求項2に記載の発明の効果に加えて、血漿及びヒト血清を容易に有効利用することができる。

【0074】請求項4に記載の発明のヒト血清の製造方法によれば、血漿を原料にすることにより、血球及び血小板を有効利用することができる。請求項5に記載の発明のヒト血清の製造方法によれば、請求項4に記載の発明の効果に加えて、血漿中の血液凝固因子を容易に凝固させて取り除くことができる。

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B065 AA93X BB25 CA46
4C087 AA01 AA02 AA04 BB35 DA15
ZC80